 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.02.06 J South Med Univ, 2016, 36(2): 186-189

临床研究

慢性乙型肝炎患者PBMCs中ROG、GATA3和T-bet mRNA水平及其意义

张 卡[1,2],舒 欣[1,2],骆海飞[1],朱凤琴[1],曹 红[1,2],徐启桓[1,2],李 刚[1,2]
[1]中山大学附属第三医院感染科,广东 广州 510630;[2]广东省肝脏疾病研究重点实验室,广东 广州 510630

摘要:目的 探讨慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC)中转录因子ROG、GATA3和T-bet mRNA水平变化及意义。**方法** 收集135例慢性乙型肝炎患者(轻度45例、中度42例、重度48例)和15例健康志愿者(正常对照组)的外周血,分离单个核细胞,提取总RNA,用实时定量PCR的方法检测ROG、GATA3和T-bet mRNA水平。应用SPSS16.0软件进行统计分析。**结果** 慢性乙型肝炎轻度、中度组和重度组患者外周血PBMCs中T-bet mRNA表达水平均明显高于健康对照组人群,组内比较差异均具有统计学意义(P<0.05)。慢性乙型肝炎重度组患者外周血PBMCs中ROG mRNA表达水平明显高于健康对照组人群、轻度组和中度组患者,差异均有统计学意义(P<0.05)。而轻度组、中度组患者和健康对照组比较差异均无统计学意义(P>0.05)。慢性乙型肝炎中度组和重度组患者外周血PBMCs中GATA3 mRNA表达水平明显高于健康对照组人群和轻度组患者,差异均具有统计学意义(P<0.05);而轻度组和健康对照、中度组患者和重度组比较差异均无统计学意义(P>0.05)。慢性乙型肝炎轻度、中度组和重度组患者T-bet/GATA3比值明显高于健康对照组人群,差异均具有统计学意义(P<0.05);但3组之间比较差异无统计学意义(P>0.05)。ROG表达水平与GATA3和T-bet/GATA3比值均无相关性(P>0.05)。**结论** ROG、GATA3和T-bet在慢性乙型肝炎患者外周血PBMCs中表达水平上调,并参与疾病的发生和疾病进展。ROG在纠正和维持Th1/Th2的新平衡状态过程中起重要作用。

关键词:慢性乙型肝炎;转录因子;ROG;GATA3;T-bet;PBMCs

ROG,GATA3 and *T-bet* mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis B

ZHANG Ka[1,2], SHU Xin[1,2], LUO Haifei[1], ZHU Fengqin[1], CAO Hong[1,2], XU Qihuan[1,2], LI Gang[1,2]
[1]Department of Infectious Diseases, [2]Guangdong Provincial Key Laboratory of Liver Disease, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Abstract: Objective To investigate the role of ROG, GATA3 and T-bet in the progression of chronic hepatitis B (CHB). **Methods** The mRNA levels of *ROG*, *GATA3* and *T-bet* in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 135 patients with CHB (including 45 mild cases, 42 moderate cases, and 48 severe cases) and 15 healthy control subjects were detected by real-time quantitative PCR. **Results** The levels of T-bet mRNA in the PBMCs were significantly higher in CHB patients than in the healthy controls (P<0.05), and also differed significantly between the 3 groups of CHB patients (P<0.05). *ROG* mRNA levels were significantly higher in severe cases of CHB than in the healthy controls and mild and moderate CHB cases (P<0.05), but were similar among the latter 3 groups (P>0.05). The mRNA level of *GATA3* in the PBMCs were significantly higher in moderate and severe CHB cases than in the healthy controls and mild CHB cases (P<0.05). The T-bet/GATA3 ratio was significantly greater in the 3 CHB groups than in the control group (P<0.05) but comparable between the 3 CHB groups (P>0.05). ROG levels were not correlated with *GATA3* levels or T-bet/GATA3 ratio in the CHB cases. **Conclusions** The mRNA levels of *ROG*, *GATA3* and *T-bet* in the PBMCs are obviously up-regulated in CHB patients and these 3 genes may participate in the progression of CHB. *ROG* plays an important role in correcting and maintaining the new balance of Th1/Th2.

Key words: hepatitis B, chronic; transcription factor; ROG; GATA3; T-bet; PBMCs

乙型肝炎病毒(HBV)持续感染和慢性化与Th1/Th2比例失衡密切相关,其中Th1细胞与乙肝病毒清除相关,Th2细胞可维持HBV慢性携带状态[1]。T-bet是Th1细胞分化特异性转录因子,不但可促进Th0细胞向Th1细胞方向分化,而且可诱导Th2细胞向Th1细胞方向转化[2]。GATA3可促进Th0细胞向Th2细胞,对Th1细胞的发育起抑制作用[3-4]。ROG是GATA3转录抑制因子,可以抑制Th2相关转录因子GATA3功能[5]。有研

收稿日期:2015-09-22
基金项目:国家自然科学基金(81500462);广东省医学科研基金(B2012122)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81500462).
作者简介:张 卡,博士,主治医师,电话:020-85252372,E-mail: zhangka613@163.com
通信作者:曹 红,博士,副教授,电话:020-82179756,E-mail: billcaohong11@163.com

究[6]发现随着慢性乙型肝炎患者肝脏炎症的加剧，T-bet和GATA3的表达呈反方向变化。而GATA3的变化是否与ROG的作用有关？ROG是否参与慢性乙型肝炎的发生和发展？目前国内外尚未见报道。本课题通过对慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞（PBMCs）内ROG、GATA3和T-bet mRNA水平检测，探讨3者慢性乙型肝炎发病过程中的变化及作用，旨为慢性乙型肝炎免疫学发病机制提供新依据。

1 资料和方法

1.1 研究对象和诊断标准

研究对象为在中山大学附属第三医院感染科住院的慢性乙型肝炎患者总135例，其中男114例，女21例，平均年龄分别为37.7±8.3岁和45.6±10.5岁。诊断均符合中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病学分会颁布的《慢性乙型肝炎防治指南》（2010年版）[7]。根据指南分3组，其中慢性乙型肝炎轻度患者45例、中度患者42例、重度患者48例。正常对照组为15例在我院体检中心体检的健康人，其中男性10例，女性5例，平均年龄分别为34.7±9.9岁和36.1±10.8岁。

1.2 标本采集和处理

患者和健康人均于早晨抽取空腹肘静脉血4~6 mL，置于EDTA-Na抗凝管中。应用密度梯度离心法分离和纯化外周血单个核细胞，用TriZol法提取细胞总RNA，置于−20 ℃保存，以备检测。

1.3 肝功能的检测

血清ALT、AST及TBil等肝功能指标我院检验科采用美国Beckman全自动生化仪及其配套试剂检测。

1.4 ROG、GATA3和T-bet mRNA的检测

采用Real Time PCR方法检测ROG、GATA3和T-bet mRNA，以β-actin作为内参系统，采用同管扩增法：每管加入目的基因上下游引物各1 μL，再加入内参β-actin上下游引物1 μL，进行PCR反应，条件如下，即得到PCR产物。PCR产物均在1.5%琼脂糖凝胶上电泳，在凝胶成像系统中拍照分析。目的基因灰度值/同泳道中内参的灰度值，所得到数据代表各细胞因子在外周血单核细胞中的表达水平。

1.5 引物设计和扩增条件

从GeneBank检索基因序列，利用Premier软件分别设计ROG、GATA3、T-bet和β-actin引物。ROG引物序列为：正向5'-GCAAGGGTTCACAGGCACA-3'和反向5'-GCTGAGGACAGAGGCTACA-3'。扩增条件：94.0 ℃ 5 min，94.0 ℃ 30 s；57.0 ℃ 30 s；72.0 ℃ 30 s；30个循环，215 bp。GATA3引物序列为：正向5'-GTGTTACCGTTCACCAGTTGC-3'和反向5'-GCAGGAATAGGGACAAGAAG-3'。扩增条件：94.0 ℃ 5 min，94.0 ℃ 30 s；60.0 ℃ 30 s，72.0 ℃ 5 min；30个循环，391 bp。T-bet引物序列为：正向5'-TGGTGCTGCGTCTTGCTTT-3'和反向5'-CTGGCGGGCTGATGGTTAT-3'。扩增条件：扩增条件：94.0 ℃ 5 min，94.0 ℃ 30 s；58.0 ℃ 30 s，72.0 ℃ 5 min；30个循环，233 bp。β-actin引物序列为：正向5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'和反向5'-CAGGAAGCAAGGCTGGAAGA-3'。扩增条件：同管扩条件同目的基因，大小为186 bp。

1.6 统计学方法

用SPSS 16.0软件分析数据。计量资料数据以均数±标准差表示，组间变量分析采用单因素方差分析；采用Pearson统计学方法进行相关性分析；以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者和健康对照组人PBMCs中ROG mRNA表达水平

慢性乙型肝炎重度组患者外周血PBMCs中ROGmRNA表达水平明显高于健康对照组人群、轻度组和中度组患者，差异均具有统计学意义（P<0.05）。而轻度组、中度组患者和健康对照组组间比较差异均无统计学意义（P>0.05，表1）。

2.2 各组患者和健康对照组人PBMCs中GATA3mRNA表达水平

慢性乙型肝炎中度组和重度组患者外周血PBMCs中GATA3 mRNA表达水平明显高于健康对照组人群和轻度组患者，差异均具有统计学意义（P<0.05，表1）。而轻度组患者和健康对照组间比较差异均无统计学意义（P>0.05，表1）。中度组患者和重度组比较差异均无统计学意义（P>0.05，表1）。

2.3 各组患者和健康对照组人PBMCs中T-bet mRNA表达水平

慢性乙型肝炎轻度、中度组和重度组患者外周血PBMCs中T-bet mRNA表达水平均明显高于健康对照组人群，差异均具有统计学意义（P<0.05，表1）。重度组患者T-bet mRNA表达水平高于轻度组和中度组，差异均具有统计学意义（P<0.05，表1）。中度组患者T-bet mRNA表达水平高于轻度组，差异均具有统计学意义（P<0.05，表1）。

2.4 各组患者和健康对照组ROG/GATA3和T-bet/GATA3比较

慢性乙型肝炎重度组患者和健康组人ROG/GATA3比值高于慢性乙型肝炎中度患者，差异有统计学意义（P<0.05）；轻度组患者ROG/GATA3比值高于中度患者，差异有统计学意义（P<0.05，表1）。其他组间对比差异无统计学意义（P>0.05）。慢性乙型肝炎轻度、中

表1 慢性乙型肝炎患者和健康对照组PBMCs中ROG、GATA3和T-bet mRNA表达水平

Tab.1 mRNA levels of ROG, GATA3 and T-bet in PBMCs of CHB patients and healthy controls (*Mean*±*SD*)

Group	*n*	ROG	GATA3	T-bet	ROG/GATA3	T-bet/GATA3
Mild CHB	45	0.67±0.15★	0.59±0.19★▽	0.55±0.16☆★▽	1.14±0.23▽	0.93±0.21☆
Moderate CHB	42	0.71±0.11★	0.72±0.14☆▲	0.64±0.09☆★▲	0.99±0.10☆▲★	0.89±0.17☆
Severe CHB	48	0.87±0.08☆▲▽	0.75±0.12☆▲	0.72±0.13☆▽▲	1.16±0.11▽	0.96±0.09☆
Control	15	0.64±0.19	0.58±0.22	0.46±0.17	1.11±0.26	0.79±0.17

☆$P<0.05$ *vs* control group; ★$P<0.05$ *vs* severe CHB group; ▽$P<0.05$ *vs* moderate CHB group; ▲$P<0.05$ *vs* mild CHB group.

度组和重度组患者T-bet/GATA3比值明显高于健康对照组人群，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）；但3组之间比较差异无统计学意义（$P>0.05$，表1）。

2.5 慢性乙型肝炎患者ROG的表达水平与GATA3 mRNA、T-bet mRNA和T-bet/GATA3比值以及GATA3 mRNA与T-bet mRNA的相关性分析

相关分析显示慢性乙型肝炎患者外周血PBMCs中ROG mRNA表达水平与GATA3 mRNA和T-bet/GATA3比值均无相关性（r=0.078和0.043，$P>0.05$）。T-bet mRNA水平与ROG mRNA和GATA-3 mRNA水平并无相关性（r=0.234和0.258，$P>0.05$）。

3 讨论

目前对于慢性乙型肝炎的发病机制仍不完全明确，众多研究发现Th淋巴细胞及其效应分子在HBV的感染、发病和疾病加重过程中起重要作用[8]。Th1淋巴细胞和其相关细胞因子不但与HBV急性或持续性肝炎的病毒清除有关，而且还与肝脏疾病的免疫病理和发病机制密切相关[9]；T-bet可促进Th0细胞向Th1细胞方向分化，还可诱导Th2细胞向Th1细胞方向转化。本研究发现HBV感染患者外周血PBMC中T-bet表达水平升高，随着病情加重，T-bet表达水平逐渐升高。此结果与国内外学者研究结果一致，表明T-bet不但与HBV的清除和疾病的自限性有关，还与慢性乙型肝炎的整个发生和发展过程[6, 10]。有研究[11-12]发现HBV的复制和肝脏损伤与CD^{8+}T淋巴细胞的耗竭有一定相关，机体通过高表达T-bet减轻HBV特异性CD^{8+}T淋巴细胞的耗竭，T-bet通过不断调整PD-1等细胞因子来减少其对CD^{8+}T淋巴细胞的耗竭，最终导致T-bet逐渐缺失。

GATA3不但可以促进Th0向Th2转化，还可以抑制其向Th1细胞的转化。最近有研究[13]发现细胞坏死溢出的核酸、免疫复合物以及组织蛋白均可以明显上调GATA3的表达。本研究结果发现慢性乙型肝炎中度组和重度组患者外周血PBMCs中GATA3 mRNA表达水平明显高于健康对照组人群；这与Yang等[14]研究发现慢性乙型肝炎患者外周血PBMC中GATA3 mRNA的表达水平比正常健康人明显增高结果相同。但是本研究也发现慢性乙型肝炎中度和重度组患者GATA-3表达水平比轻度组患者升高；GATA-3的表达水平与随着病情加重逐渐升高趋势；与Yang等[14]研究发现慢性乙型肝炎GATA3 mRNA的表达水平与肝脏损伤程度无相关性的结论不同。GATA3的表达与T-bet并无明显相关性。我们考虑原因可能如下：其一，研究样本量大小有关；其二，随着肝脏炎症加剧，机体免疫反应增强，坏死的肝细胞溢出的核酸和免疫复合物上调GATA3的表达。因此慢性乙型肝炎轻度患者外周血PBMCs中GATA3 mRNA表达水平比健康人升高并不明显。

ROG是一种淋巴细胞特异性基因，可完全抑制GATA3对Th2细胞因子IL-4和IL-5启动子的激活作用，但是对T-bet的功能无抑制作用[15]。有研究[5, 16]显示ROG通过对Th2细胞免疫反应的负调控影响T淋巴细胞的分化和增殖，最终在接触性高敏反应性疾病的发病过程中起重要作用。本研究结果显示ROG仅仅在慢性乙型重度肝炎患者外周血PBMC中表达升高明显，在轻度和中度肝炎患者中的表达水平并无明显升高。因此，我们推测随着慢性乙型肝炎病情加重，机体免疫由Th1向Th2的漂移，ROG可迅速表达，并完全抑制GATA3对Th2细胞因子IL-4和IL-5启动子的激活作用，最终维持机体内Th1/Th2的新平衡。我们进一步研究发现ROG/GATA3的比值在慢性乙型肝炎的发病过程变化无明确规律性，ROG表达水平与GATA3表达水平无直接相关性，表明两者的表达在慢性乙型肝炎发病过程中不同步，ROG通过抑制GATA3的功能而影响Th2的表达，但不影响GATA3的表达，没有直接证据显示ROG影响Th1的表达。

有研究显示[17-18]急性乙型肝炎细胞因子谱中急性期以Th1为主，恢复期以Th2为主，前者与病毒清除有关，后者可维持HBV慢性携带状态，Th1/Th2的失衡与HBV清除和疾病严重程度有关。在Th1/Th2细胞分化的众多因素中，转录因子T-bet和GATA-3起到重要作用，因此T-bet/GATA-3的水平一定程度反映了Th1/Th2的水平[19]。本研究结果发现慢性乙型肝炎患者体内的T-bet/GATA-3的水平均与健康人不同，但是T-bet/GATA-3的水平并不随疾病的加重而存在差异；反映了

Th1/Th2在慢性乙型肝炎的发病过程中一致处于失衡状态,但是这种失衡并不随病情的加重而出现明显差异。根据本研究结果,我们推测ROG、T-bet和GATA3参与慢性乙型肝炎发病的过程可能如下:T-bet表达在肝脏炎症初期开始并逐渐增多,Th1处于优势,有利于机体清除病毒的同时导致肝细胞损伤加重,T-bet逐渐耗竭,Th1/Th2逐渐失衡;机体通过各种调控通路促使GATA3的表达和Th2细胞分化,防止Th1/Th2失衡加重;同时机体又通过ROG的过表达负向调控Th2细胞分化,纠正和调整Th1/Th2的水平,最终维持Th1/Th2的相对平衡,最终达到清除病毒的同时,最大程度减轻肝脏损伤的目的,防止病情重症化。

综上所述,慢性乙型肝炎患者PBMCs中ROG、GATA3和T-bet水平表达上调,三者均参与了慢性乙型肝炎的发病和疾病进展。深入研究ROG、GATA3和T-bet在慢乙肝发病过程的作用机制,可为慢性乙型肝炎的发病机制提供新的理论和思路。

参考文献:

[1] Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection[J]. Gut , 2012, 61: 1754-64.

[2] Oh YJ, Shin JH, Won HY, et al. Anti-proliferative Activity of T-bet [J]. Immune Netw, 2015, 15(4): 199-205.

[3] Tindemans I, Serafini N, Di Santo JP, et al. GATA-3 function in innate and adaptive immunity[J]. Immunity, 2014, 41(2): 191-206.

[4] Wan YY. GATA3: a master of many trades in immune regulation[J]. Trends Immunol, 2014, 35(6): 233-42.

[5] Hirasaki Y, Iwamura C, Yamashita M, et al. Repressor of GATA negatively regulates murine contact hypersensitivity through the inhibition of type-2 allergic responses[J]. Clin Immunol, 2011, 139 (3): 267-76.

[6] 杨 智, 陈洪涛, 张 毅, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染者外周血单个核细胞中T-bet、GATA3和FoxP3 mRNA的表达及其意义[J]. 吉林大学学报:医学版, 2013, 39(5): 953-9.

[7] 中华医学会肝病学分会. 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 13-24.

[8] Li X, Liu X, Tian L, et al. Cytokine-Mediated Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus Infections[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2014: 1-14.

[9] Lian JQ, Yang XF, Zhao RR, et al. Expression profiles of circulating cytokines, chemokines and immune cells in patients with hepatitis B virus infection[J]. Hepat Mon, 2014, 14(6): e18892.

[10] Kurktschiev PD, Raziorrouh B, Schraut W, et al. Dysfunctional CD^{8+} T cells in hepatitis B and C are characterized by a lack of antigen-specific T-bet induction[J]. J Exp Med, 2014, 211(10): 2047-59.

[11] Ye B, Liu X, Li X, et al. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance[Z]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1694.

[12] 高月求, 姚 嫣, 李 曼. 慢性乙型肝炎患者外周血CD^{8+}T淋巴细胞部分免疫效应分子的表达特征[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(7): 1606-9.

[13] Imanishi T, Ishihara C, Badr MS, et al. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation[Z]. Nat Commun, 2014, 5: 3566.

[14] Yang Z, Tang T, Wei X, et al. Type 1 innate lymphoid cells contribute to the pathogenesis of chronic hepatitis B[J]. Innate Immun, 2015, 21(6): 665-73.

[15] Kurata H, Lee HJ, Mcclanahan T, et al. Friend of GATA is expressed in naive Th cells and functions as a repressor of GATA-3-mediated Th2 cell development[J]. J Immunol, 2002, 168 (9): 4538-45.

[16] Kita H. Is ROG, repressor of GATA, a specific regulator of Th2-type immune response[J]. Clin Immunol, 2011, 139(3): 235-7.

[17] He Y, Gao H, Li X, et al. Psychological stress exerts effects on pathogenesis of hepatitis B via type-1/type-2 cytokines shift toward type-2 cytokine response[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105530.

[18] 姜荣龙, 卢桥生, 郭亚兵, 等. Th1/Th2细胞在慢性乙型肝炎病毒感染中的作用[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(2): 103-5.

[19] Nasta F, Ubaldi V, Pace L, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibits GATA-3 but not T-bet mRNA expression during T helper cell differentiation[J]. Immunology, 2006, 117(3): 358-67.

(编辑:经 媛)